



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

ارتباط بین برخی سموم ارگانوکلره استفاده شده در کشاورزی با تغییرات اپی ژنتیک در

بیماران با سرطان پستان در استان کرمان در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴

توسط: پریسا پایدار

استاد راهنما: دکتر غلامرضا اسدی کرم

استاد مشاور: دکتر وحید معاضد- دکتر حسین فلاح

سال تحصیلی: ۱۳۹۷-۹۸

چکیده فارسی:

مقدمه و اهداف: سرطان پستان به عنوان یک بیماری چند فاکتوری مطرح می باشد که اتیولوژی آن ژنتیکی، شیوه زندگی و فاکتورهای محیطی می باشند. در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی ارتباط سموم ارگانو فسفره و ارگانوکلره مورد استفاده در کشاورزی با تومورهای پستان به دو فاکتور خطر مهم در بروز تومورهای پستان که استرس اکسیداتیو و اثرات اپی ژنتیکی می باشد پرداخته شد. سموم ارگانوکلره با اثر بر روی مسیرهای مختلف سیگنالینگ در بدن سرطان پستان را القا می کنند. یک مکانیسم پیشنهادی، اثر سموم بر فاکتورهای اپی ژنتیکی می باشد. به همین دلیل در این مطالعه متیلاسیون در پروموتور سه ژن سرکوب کننده تومور *BRCA-1*، *P16* و *MGMT* و همچنین میزان متیلاسیون و استیلاسیون سه پروتئین هیستونی بررسی گردید. همچنین برخی از فاکتورهای ارزیابی میزان استرس اکسیداتیو شامل فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، فعالیت آریل استراز، پاراکسوناز، میزان مالون دی آلدئید و میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در افراد مبتلا به بیماری های پستان و افراد سالم بررسی گردید.

روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، در مجموع ۲۷ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۶ بیمار با بیماری های خوش خیم پستان و ۲۷ فرد سالم انتخاب گردید. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز براساس روش اصلاح شده المن و توسط ماده واکنشگر دی تیویس-نیتروبنزوئیک اسید اندازه گیری شد. فعالیت آریل استراز پاراکسوناز-۱ با افزودن سوبسترای فنیل استات و توسط اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین سطح سرمی مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی به ترتیب براساس پروتوکل کیت نالوندی^۱ و ناکسیفر^۲ اندازه گیری شد. پس از استخراج سموم ارگانوکلره، سطح سرمی این سموم با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی اندازه گیری شد. DNA ژنومی استخراج شده بعد از تیمار با بی سولفیت سدیم با استفاده از Methylation-specific PCR بررسی گردید. میزان تغییرات متیلاسیون و استیلاسیون پس از ترجمه ای در سه جایگاه ویژه از پروتئین های هیستونی با استفاده از آنتی بادی های مخصوص و از طریق روش وسترن بلات اندازه گیری گردید.

¹Nalondi

²Naxifer

یافته‌ها: در هر دو گروه از بیماران با سرطان پستان و بیماری های خوش خیم پستان، میزان فعالیت آنزیم های آریل استراز و استیل کولین استراز پایینتر از افراد کنترل بوده است. میانگین میزان پلاسمایی مالون دی آلدئید در هر دو گروه بیماران بالاتر از افراد کنترل بوده است. میزان پلاسمایی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در هر دو گروه از بیماران پایینتر از افراد کنترل بوده است ولی این مقدار از لحاظ آماری معنی دار نبوده است. نتایج حاضر در این مطالعه آشکار نموده اند که میانگین سرمی غلظت 2,4-DDT به طور قابل توجهی در بیماران با سرطان پستان و بیماری های خوش خیم پستان بالاتر از افراد کنترل بوده است. همچنین میانگین سرمی 4,4-DDE در بیماران با سرطان پستان در مقایسه با افراد با بیماری های خوش خیم پستان و افراد سالم بالاتر بوده است. نتایج حاصل از بررسی متیلاسیون نشان دادند که میزان متیلاسیون در پروموتور ژنهای *BRCA-1* و *MGMT* در نمونه های بافتی بیماران با سرطان پستان بیشتر از افراد با بیماری های خوش خیم پستان بوده است. در خصوص ارتباط بین میزان سموم ارگانوکلره و متیلاسیون در ژنهای مطالعه شده همبستگی پیدا نشد. در بررسی پروتئین های هیستونی، میزان H4K20me3 و H3K18ac در نمونه ای بافتی افراد با سرطان پستان پایینتر از نمونه های خوش خیم پستان بوده است. همبستگی منفی بین میزان H3K18ac و HCH در گروه افراد با بیماری های خوش خیم پستان دیده شد.

نتیجه گیری: این مطالعه حضور میزان بالای استرس اکسیداتیو در هر دو گروه از بیماران با سرطان پستان و بیماری های خوش خیم پستان را نشان می دهد. فعالیت کم آنزیم های استیل کولین استراز اریتروسیستی و آریل استراز پلاسمایی ممکن است به دلیل در معرض بودن افراد مورد مطالعه با سموم ارگانو فسفره و دیگر مواد اکسیدان باشد. به طوریکه مالون دی آلدئید که نشان دهنده افزایش واکنش های اکسیداتیو در بدن می باشد، در مطالعه حاضر به طور معنی دار در افراد با تومورهای پستانی بالاتر از افراد سالم بوده است. همچنین بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه، اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می تواند به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در کنار آنتی اکسیدان های دیگر، در بیماران با سرطان پستان و بیماری های خوش خیم پستان در نظر گرفته شود. میزان بالای سم ارگانوکلره 2,4-DDT در سرم بیماران با تومورهای بدخیم و خوش خیم پستان نشان می دهد که این سم خطر ابتلا به تومورهای پستانی را افزایش می دهند. حضور بالای سم 4,4-DDE در نمونه های سرمی بیماران با تومورهای بدخیم در مقایسه با بیماری های خوش خیم پستان و افراد کنترل نشان می دهد که این سم می تواند خطر سرطان پستان را افزایش دهد. هیپرمتیلاسیون در

پروموتور ژنهای *BRCA-1* و *MGMT* در نمونه های توموری بدخیم نشان می دهد که این تغییرات اپی ژنتیک می توانند در اتیولوژی سرطان پستان مهم به شمار آیند. از آنجایی که برخی از بیماران با تومورهای خوش خیم پستان نیز متیلاسیون در پروموتور ژن *BRCA-1* را داشته اند لذا این موضوع این گروه را در خطر بالاتر برای ابتلا به سرطان پستان قرار می دهد. عدم حضور متیلاسیون در پروموتور ژن *MGMT* در تومورهای خوش خیم، نشانه اختصاصی بودن متیلاسیون این ژن در تومورهای بدخیم و بیماران با سرطان پستان می باشد. میزان کاهش یافته مارکرهای هیستونی H4K20me3 و H3K18ac در تومورهای بدخیم نسبت به تومورهای خوش خیم نشانه اهمیت تغییرات اپی ژنتیکی در ایجاد و پیشرفت تومورهای سرطانی پستان می باشد. به دلیل حضور همبستگی منفی بین میزان بافتی H3K18ac و میزان سرمی HCH در افراد با تومورهای خوش خیم پستان ممکن است تغییرات اپی ژنتیکی یکی از مکانیسم هایی باشد که سموم ارگانوکلره با واسطه آن اثرات مضر خود در سلامت انسان را اعمال می کنند.

کلید واژه ها: تومور پستان؛ سرطان پستان؛ استرس اکسیداتیو؛ سموم ارگانوکلره؛ متیلاسیون DNA؛ متیلاسیون و

استیلاسیون هیستون

Abstract:

Background and Objectives: Breast cancer is a multifactorial disease with various causes including genetics, life styles and environmental factors. In this study, in order to evaluate the relationship between organophosphorus and organochlorine pesticides used in agriculture with breast tumors, two important risk factors for the occurrence of breast tumors namely oxidative stress and epigenetic effects were investigated. several possible molecular mechanisms of organochlorine pesticides have been suggested in development of cancer, one of them is epigenetic modification. For this reason, we investigated the promoter methylation of three BRCA-1, P16 and MGMT tumor suppressor genes, as well as methylation and acethylation of three histone proteins in the present study. Moreover, we evaluated erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and plasma arylesterase (ARE) activities, plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) levels in patients with breast tumors and healthy individuals.

Methods: The present study was composed of 27 patients with malignant breast tumors (MBT), 36 benign breast tumors (BBT), and 27 healthy subjects as a control group (CON). The activity of acetylcholinesterase enzyme was measured according to Elman's modified method and by the reaction of di-thiobis-nitrobenzoic acid. The arylesterase activity of Paraoxonase-1 was evaluated by phenylacetate substrate and a spectrophotometer. Serum levels of malondialdehyde and antioxidant capacity were also measured based on the Nalvandi and Naqsifer kit protocols, respectively. After extracting organochlorine pesticides, the serum levels of these pesticides were measured by gas chromatography. Genomic DNA was extracted from each sample and treated with Bisulfite Sodium, then methylation specific PCR (MSP) was used for determining the promoter methylation. The rate of post translational methylation and acethylation of histone proteins in three specific sites were measured using specific antibodies and by Western Blot method.

Results: In both case groups, MBT and BBT, ARE and AChE activities were found significantly lower as compared to control group. The mean plasma levels of MDA in both MBT and BBD were higher than those in CON. Plasma total antioxidant capacity in both groups of patients was lower than control subjects, but this level was not statistically significant. The mean concentrations of 2,4-DDT were significantly higher in MBT and BBT groups compared to

control. The mean levels of 4,4 DDE were significantly higher in MBT patients compared to BBT and control. Promoter methylation of *BRCA1* and *MGMT* was significantly higher in MBT patients compared to BBT. No significant interactions were found between organochlorine pesticides and DNA methylation of three genes within both MBT and BBT groups. Lower levels of H4K20me3 and H3K18ac were found in MBT compared to BBT. There was a good negative correlation between H3K18ac and HCH levels in BBT.

Conclusion: This study shows the presence of high levels of oxidative stress in both groups of patients with breast cancer and benign breast diseases. Low activity of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma arylesterase enzymes may be due to exposure to organophosphorus pesticides and other oxidant substances. Malondialdehyde, which shows an increased level in oxidative reactions in the body, was significantly higher in subjects with mammary tumors than in healthy subjects. Based on the findings of this study, the evaluation of AChE activity can be considered as an indicator of oxidative stress along with other antioxidants in patients with breast cancer and benign breast diseases. The high levels of 2,4-DDT in the serum samples of malignant and benign breast tumors suggest that this pesticide may increase the risk of developing breast mammary tumors. The presence of high levels of 4,4-DDE in serum samples of patients with malignant tumors, compared with benign breast diseases and controls, suggests that this pesticide can increase the risk of breast cancer. Hypermethylation in the promoter of *BRCA-1* and *MGMT* genes in malignant tumor samples suggests that these epigenetic changes can be important in the etiology of breast cancer. Since some patients with benign breast tumors also had methylation in the promoter of the *BRCA-1* gene, this would place this group at higher risk for breast cancer. The absence of methylation of the *MGMT* gene promoter in patients with benign breast tumors is indicative of the specificity of this gene in patients with malignant tumors and breast cancer. The reduced rate of H3K18ac and H4K20me3 histone markers in malignant tumors compared to benign tumors indicates the importance of epigenetic changes in the development of breast cancer tumors. Because of the presence of a negative correlation between H3K18ac and HCH levels in patients with benign breast tumors, Histone modifications may be an underlying mechanism of organochlorine pesticides-induced adverse health effects.



Kerman University of Medical Science

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

(Ph.D.)

**Association between some Organochlorine pesticides used in agriculture with
Epigenetic alterations in breast cancer patients in Kerman province during of
1394-1395**

BY:

Parisa Paydar

Supervisor:

1- Dr. Gholamreza Asadikaram

Advisors:

1. Dr. Vahid Moazed

2. Dr. Hossein Fallah

Year:

2019